



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 24 154 A 1**

⑤ Int. Cl.7:  
**C 12 N 11/00**  
C 12 M 1/00  
B 01 J 13/04

⑳ Aktenzeichen: 100 24 154.9  
㉔ Anmeldetag: 19. 5. 2000  
㉓ Offenlegungstag: 22. 11. 2001

DE 100 24 154 A 1

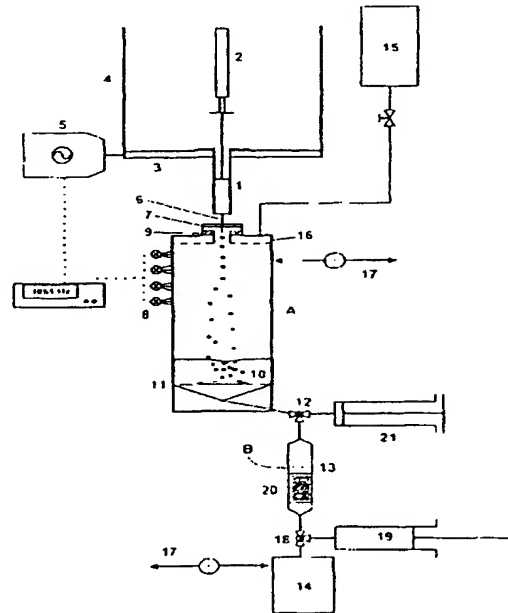
㉑ Anmelder:  
Inotech Encapsulation AG, Dottikon, CH  
  
㉒ Vertreter:  
Hiebsch Peege Behrmann, 78224 Singen

㉑ Erfinder:  
Heinzen, Christoph, Dr., Boniswil, CH; Berger,  
Andreas, Dipl.-Ing., Mühledorf, CH; Widmer, Fritz,  
Prof. Dr., Gockhausen, CH; Studer, Michael,  
Dipl.-Ing., Zürich, CH

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

㉓ Verfahren und Vorrichtung zur Verkapselung von Zellen

㉔ Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Verkapseln von mikrobiellen, pflanzlichen und/oder tierischen Zellen bzw. von biologischen und chemischen Substanzen mittels einer Düse in kleine i. w. kugelförmige Teilchen durch Vibration eines Immobilisierungsgemisches, wobei die Vibration auf eine das Immobilisierungsgemisch enthaltende Spritzpumpe (1, 2) übertragen wird, die schwingend gelagert und mit einer Oszillationseinheit (5) verbunden ist.



DE 100 24 154 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Verkapseln von menschlichen und tierischen Zellen durch eine Düse in kleine, i. w. kugelförmige Teilchen unter Zuhilfenahme von Einwegbehältern. Ein derartiges Verfahren ist aus der DE 199 10 251 A1 der Anmelderin bekannt.

[0002] Die Verkapselung von mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Zellen und von biologischen und chemischen Substanzen – wie Katalysatoren – ist vor allem in der Biotechnologie und der Medizin zur Immobilisierung von grosser Bedeutung. In der Medizin dient die Verkapselung zusätzlich zum Abschirmen vor dem Immunsystem. Durch die Immobilisierung ist es möglich, die Zellen oder den Katalysator im Prozess zurückzuhalten und gleichzeitig das Produkt zu ernten. Dadurch sind ein verlängerter Nutzen und eine erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute möglich. Durch die Abschirmung der Zellen vor dem Immunsystem ist es möglich, einem Patienten körperfremde Zellen zu implantieren, die über längere Zeit einen gewünschten Stoff in den Körper des Patienten abgeben, ohne dass sie durch das Immunsystem des Patienten angegriffen und zerstört werden.

[0003] Die Verkapselung von Zellen und Katalysatoren in Biopolymere – wie Carrageenan oder Alginat – und synthetische Polymere – wie Polyacrylamid – ist eine in Forschungslabors seit einigen Jahren angewandte Methode. In der Literatur werden dafür viele verschiedene Vorrichtungen beschrieben. Eine der effizientesten Methoden ist das Zerteilen eines Strahles durch die Überlagerung einer externen Schwingung auf die Immobilisierungsflüssigkeit. Die Flüssigkeit wird dadurch beim laminaren Ausströmen aus einer Düse in gleichgrosse Fraktionen aufgeteilt. Mehrere Methoden zur Schwingungsübertragung werden genutzt oder beschrieben, z. B. Koppelung an einen Vibrator, Piezokristall, Schallwellen.

[0004] Die eingangs zitierte Druckschrift der Anmelderin zeigt ein kommerzielles Verkapselungsgerät, bei dem die Schwingung mittels einer Pulsationskammer auf das Immobilisierungsgemisch übertragen wird. Die gesamte Verkapselungsreaktion findet in einem aus rostfreiem Stahl und Glas bestehenden Reaktionsbehälter statt, der zuvor in einem handelsüblichen Autoklaven sterilisiert wurde. Die hergestellten Mikrokugeln werden in diesem Behälter verfestigt und unter Umständen weiterbehandelt – z. B. mit dem Aufbringen von zusätzlichen Membranschichten. Will man für medizinische Anwendungen – bspw. Diabetes oder Krebstherapien – Zellen verkapseln, stehen in der Regel nur kleine Volumina (1–5 ml) zur Verkapselung zur Verfügung. Deshalb hat diese Methode die Schwierigkeit, dass, bedingt durch das grosse Totvolumen des Systems, ein Grossteil des Verkapselungsmaterials im System verlorengeht, was bei der Verkapselung von menschlichen Zellen inakzeptabel ist. Ausserdem birgt das Konzept der Wiederverwertbarkeit des Reaktionsbehälters durch Autoklavieren eine gewisse Gefahr der Cross-Contamination, welche nur mit grossem zeitlichen und technischen Aufwand begegnet werden könnte. Als weitere Schwierigkeit muss die grosse Flexibilität des in der Anmeldung DE 199 10 251 beschriebenen Systems gesehen werden, die – im Forschungs- und Entwicklungsbereich – als sehr notwendige Einrichtung, im Produktionsbereich im medizinischen Umfeld als hinderlich oder störend gelten kann.

[0005] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine gattungsgemäße Vorrichtung bzw. ein bekanntes Verfahren im Hinblick auf seine Eignung speziell für kleine Nutzvolumina bzw. nur geringe Mengen von Immobilisierungsgemisch zu verbessern, wobei insbesondere Abfall-

bzw. nicht nutzbare Mengen von Wirkstoff zu minimieren sind. Ferner ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Empfindlichkeit bekannter Vorrichtungen gegen Verschmutzung zu überwinden und somit eine Vorrichtung bzw. ein Verfahren zu schaffen, welches insbesondere einen zum Sterilisieren bzw. Reinigen benötigten Aufwand deutlich vermindert.

[0006] Die Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie die Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 7 gelöst; vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen. Zusätzlich gelten als von der vorliegenden Erfindung mitumfasst sämtliche aus den vorliegenden Unterlagen erkennbaren Vorrichtungs- und/oder Verfahrensmerkmale, einzeln oder in beliebiger Kombination.

[0007] Ergänzend gilt der Offenbarungsgehalt der DE 199 10 251 A1, so er der Lehre der vorliegenden Offenbarung nicht entgegensteht, als in die vorliegende Anmeldung einbezogen, insbesondere im Hinblick auf weitere Details der Erzeugung und/oder Behandlung von kugelförmigen Teilchen.

[0008] Nach einer Realisierungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird das Immobilisierungsgemisch in eine handelsübliche sterile Spritze, die mit einer speziellen Nadel bestückt ist, aufgenommen. Die Spritze mit der Nadel wird durch eine Membran in einen sterilen Kunststoffbehälter, den Einweg-Reaktionsbehälter, gestossen. Eine Vorschubeinrichtung drückt das Immobilisierungsgemisch durch die spezielle Nadel, und es bildet sich ein laminarer Flüssigkeitsstrahl aus. Die Spritze ist mit einem Vibrator verbunden, welcher eine harmonische Schwingung auf die Spritze überträgt und dabei den Strahl in gleichgrosse Teile aufteilt. Vorzugsweise wird in der Nähe der Nadel ein elektrisches Feld aufgebaut, so dass im Flüssigkeitsstrahl ein elektrischer Ladungsfluss entsteht, wodurch die entstehenden Tropfen eine elektrische Ladung erhalten. Diese Aufladung muss so hoch sein, dass die Kugeln sich aufgrund der gleichartigen Ladung gegenseitig abstossen und sich die anfänglich einzelsträngig vorhandene Kugelschleife in viele Teilketten aufteilt. Dazu werden Spannungen vorzugsweise im Bereich von 200 bis 1600 V benötigt. Durch den Dispergierungseffekt fallen die Kugeln nicht mehr auf einem eng begrenzten Gebiet auf die Oberfläche des Härtungsbades, sondern sie werden weit zerstreut.

[0009] Die somit hergestellten Kugeln härten im Gelierungsbad, welches im Einweg-Reaktionsbehälter bereits vorliegt. Waschschritte oder andere Prozessschritte werden in einem getrennten Behälter durchgeführt, wobei diese Behälter aus Kunststoff gebildet und auch zum einmaligen Gebrauch bestimmt sind. Der Benutzer sammelt typischerweise die Kugeln am Schluss des Herstellungsprozesses in einer weiteren Spritze und kann sie ggf. direkt einem Patienten eintransplantieren.

[0010] Mittels dieser Vorgehensweise ist es möglich, kleine Verkapselungsvolumina, z. B. 1–5 ml Zellen und Alginatlösung, praktisch verlustfrei zu Kugeln zu verarbeiten. Gleichzeitig steht dem Benutzer ein einfaches Verfahren zur Verfügung, bei welchem er – dank des Einsatzes von Einwegeinheiten – keine aufwendigen Reinigungsmaßnahmen zwischen mehreren Produktionsansätzen erwarten muss.

[0011] Das in der vorliegenden Patentschrift beschriebene Verfahren und Vorrichtung weist ansonsten dieselben Produktionsschritte wie die zitierte Schrift zum Stand der Technik auf. Das heisst, dass die hergestellten Kugeln eine runde und kugelförmige Form aufweisen, dass sie ein monodisperses Korngrössenspektrum besitzen und dass mit dieser Vorrichtung ebenfalls sehr kleine Kugeln (etwa 100–1000 µm)

unter sterilen und reproduzierbaren Bedingungen hergestellt werden können. Ebenfalls zeichnet sich das vorliegende Verfahren durch eine hohe Produktivität aus, so kann etwa eine Batchgrösse von 2 ml in weniger als einer Minute zu kleinen Kugeln verarbeitet werden.

[0012] Weitere Vorteile, Merkmale und Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele sowie anhand der einzigen Zeichnung, diese zeigt in

[0013] Fig. 1 eine Seitenansicht einer erfindungsgemässen Vorrichtung.

[0014] In der dargestellten Anlage für das sterile Verkapseln mikrobieller, pflanzlicher und tierischer Zellen wird mit einer Spritzenpumpe 2 – welche pneumatisch oder mechanisch betrieben wird – der Spritzenkolben 1 vorgestossen, um damit das Immobilisierungsgemisch, das in die Spritze aufgenommen wurde und aus Zellen und Polymerlösung besteht, zu fördern. Die Spritze ist in eine Halterung 3 gespannt, welche die Spritze an ihrem gesamten Umfang festklemmt. Die Halterung ist an zwei Federstahl-Bändern 4 aufgehängt, welche die vertikalen Kräfte aufnehmen, die durch das Ausstossen der Spritze entstehen. Die Spritzenhalterung kann transversal schwingen, und übernimmt die Schwingungsübertragung eines Pulsators 5 auf die Nadel 6, welche als Düse fungiert. Mit dieser Nadel kann eine Sterilmembran 7 (die als Sterilbarriere dient, gleichzeitig jedoch Vibration der Nadel zulässt) zum Einweg-Reaktionsbehälter A durchstoßen und das Immobilisierungsgemisch zertropfen werden.

[0015] Die einzelnen Tropfen werden im Licht von getriggerten Leuchtdioden 8 sichtbar. Der Tropfen-Strahl wird durch elektrostatische Aufladung über einen Metallring im Hals 9 des Einweg-Reaktionsbehälters A aufgeweitet. Die Tropfen fallen in eine Härtungslösung 10 und härten dort sofort aus.

[0016] Um Koaleszenz zu verhindern, muss das Härtungsbad 10 leicht gerührt werden. Dies wird mit einem Magnet-Rührstäbchen, das auf einem grobmaschigen Edelstahl-Netz 11 dreht, erreicht. Die ausgehärteten Kugeln werden über den Sammelkonus im Boden des Einweg-Reaktionsbehälter A und über ein Dreiwegventil 12 zu einem Feinsieb 13 abgeleitet. Die Kugeln bleiben auf dem Feinsieb zurück, die überschüssige Härtungslösung fliesst in ein Abwasser-Gefäss 14 ab.

[0017] Die Kugeln müssen in der Regel gewaschen werden. Die Waschflüssigkeit wird hierzu aus einem Vorratsbehälter 15 über einen Verteilboden im Deckel 16 des Einweg-Reaktionsbehälter A in das System gebracht. Die möglicherweise im Einweg-Reaktionsbehälter A und in den Verbindungsschläuchen verbliebenen Kugeln werden somit ebenfalls auf das Feinsieb 13 gespült.

[0018] Der erforderliche Druckausgleich gegenüber der Umgebung erfolgt während des Prozessablaufs über Steril-luftfilter 17. Nach dem Waschvorgang müssen sie resuspendiert und in eine Injektionsspritze gebracht werden. Dazu werden die Dreiwegventile 12, 18 umgestellt, und die Resuspendierungsflüssigkeit wird manuell aus der Vorrats-spritze 19 in den Feinsieb-Behälter B gedrückt. Dort werden die Kugeln durch die einem Laminar-Gitter 20 beruhigte Strömung als Pfropfen auf- und in eine Sammelspritze 21 geschwemmt. Deren Kolben wird mit zunehmendem Volumen von selbst ausgefahren. Somit liegen die verkapselten Zellen in einer Lösung vor und können nun weiterverwendet werden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Verkapseln von mikrobiellen,

pflanzlichen und/oder tierischen Zellen bzw. von biologischen und chemischen Substanzen mittels einer Düse in kleine i. w. kugelförmige Teilchen durch Vibration eines Immobilisierungsgemisches, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vibration auf eine das Immobilisierungsgemisch enthaltende Spritzenpumpe (1, 2) übertragen wird, die schwingend gelagert und mit einer Oszillationseinheit (5) verbunden ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mittels einer externen Vibration ein laminarer Flüssigkeitsstrom des Immobilisierungsgemisches aus der Spritzenpumpe in gleichgroße kugelförmige Teilchen geteilt wird, wobei bevorzugt die externe Vibration in einer Richtung senkrecht zum Flüssigkeitsstrom auf die Spritzenpumpe übertragen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Düse eine Spritzennadel (6) der Spritzenpumpe (1, 2) verwendet wird, die durch eine Sterilmembran (7) in einen Härtungsbehälter (B) hineinreicht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die kugelförmigen Teilchen in einem elektrischen Feld zwischen der Düse (6) und dem Härtungsbad (A) mit einer elektrischen Ladung versehen werden, die so eingestellt ist, dass die Teilchen sich gegenseitig abstoßen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Spritzenpumpe, insbesondere eine Einwegspritze, mittels der externen Oszillationseinheit (5) in Schwingungen versetzt wird, die zwischen 400 und 5.000 Hz betragen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Immobilisierungsgemisch mittels eines Kolbens (1) so durch die Düse (6) der Spritzenpumpe in den Härtungsbadbehälter (A) gedrückt wird, dass eine laminare Strömung entsteht, die vorzugsweise 1–50 ml/min beträgt.

7. Vorrichtung zum Verkapseln von mikrobiellen, pflanzlichen und/oder tierischen Zellen bzw. von biologischen und chemischen Substanzen mittels einer Düse in kleine i. w. kugelförmige Teilchen durch Vibration eines Immobilisierungsgemisches, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine pneumatisch oder mechanisch betriebene Spritzenpumpe (1, 2) für das Immobilisierungsgemisch an einem federnden Halteelement (3, 4) aufgehängt ist, welches zum Aufnehmen vertikaler Kräfte ausgebildet ist und eine transversale Schwingung der Spritzenpumpe erlaubt.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das federnde Halteelement mit einer Oszillationseinheit (5) so verbunden ist, dass eine Vibration der Oszillationseinheit die transversale Schwingung der Spritzenpumpe bewirkt.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Düse eine Spritzennadel (6) der Spritzenpumpe mit zum Erzeugen der kugelförmigen Teilchen geformtem Endstück verwendet wird, welche vorzugsweise 0,1–1 mm Kanüldurchmesser aufweist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen Härtungsbadbehälter (A) mit einem Sammelkonus aufweist, der vorzugsweise einen Durchmesser von 60 bis 120 mm und eine Höhe von 150 bis 200 mm besitzt und zum Aufnehmen gehärteter kugelförmiger Teilchen ausgebildet ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, dass dem Härungsbadbehälter (A) ein Behälter (B) mit einem Feinsieb (13) nachgeschaltet ist, welches vorzugsweise eine Maschenweite von 50–100 µm sowie ferner ein laminares Gitter (20) zum Kontrollieren der Strömungen von Waschvorgängen aufweist. 5

12. Vorrichtung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Spritzennadel und dem Härungsbad (B) eine elektrische Spannung angelegt ist, die vorzugsweise 400–2.000 Volt beträgt.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 12, 10  
dadurch gekennzeichnet, dass alle oder einzelne Bestandteile der Vorrichtung, insbesondere Behälter, Verbindungen und/oder Ventile, aus in der Medizin zugelassenen Kunststoffteilen hergestellt sind, vorzugsweise aus Polycarbonat, Polyester und/oder Teflon. 15

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Spritzenpumpe und/oder der Härungsbadbehälter (B) zur Einmalverwendung ausgebildet und vorgesehen sind. 20

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

